

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-133994

⑤ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)6月6日

C 12 P 7/64
 //(C 12 P 7/64
 C 12 R 1:65)
 (C 12 P 7/64
 C 12 R 1:645)
 (C 12 P 7/64
 C 12 R 1:785)
 (C 12 P 7/64
 C 12 R 1:845)

7236-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑭ 発明の名称 γ-リノレン酸を含有する脂質の製造方法

⑮ 特 願 昭61-279147

⑯ 出 願 昭61(1986)11月21日

⑰ 発 明 者 西 村 実 東京都墨田区本所1丁目3番7号 ライオン株式会社内
 ⑱ 発 明 者 長 谷 川 成 人 東京都墨田区本所1丁目3番7号 ライオン株式会社内
 ⑲ 発 明 者 岩 崎 亮 三 東京都墨田区本所1丁目3番7号 ライオン株式会社内
 ⑳ 出 願 人 ライオン株式会社 東京都墨田区本所1丁目3番7号
 ㉑ 代 理 人 弁理士 小島 隆司

明 細 書

1. 発明の名称

γ-リノレン酸を含有する脂質の製造方法

2. 特許請求の範囲

1. アビシディア属、モルティエラ属、ムコール属、リゾプス属又はシンセファラストラム属に属する菌を脂肪酸又はそのエステルを炭素源として培養し、この脂肪酸又はそのエステルをγ-リノレン酸に変換することを特徴とするγ-リノレン酸を含有する脂質の製造方法。

2. アビシディア属に属する菌がアビシディア・コリムビフェラである特許請求の範囲第1項記載の製造方法。

3. モルティエラ属に属する菌がモルティエラ・イサベリナである特許請求の範囲第1項記載の製造方法。

4. ムコール属に属する菌がムコール・アンビグナスである特許請求の範囲第1項記載の製造方法。

5. リゾプス属に属する菌がリゾプス・オリゼーである特許請求の範囲第1項記載の製造方法。

6. シンセファラストラム属に属する菌がシンセファラストラム・ラセモサムである特許請求の範囲第1項記載の製造方法。

7. 脂肪酸又はそのエステルとしてカプロン酸、カプリル酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸及びリノール酸並びにそれらのエステルから選ばれた1種又は2種以上を使用した特許請求の範囲第1項乃至第6項いずれか記載の製造方法。

8. 脂肪酸又はそのエステルとしてパーム油、大豆油、米糠油、ナタネ油、コーン油、ヒマシ油及び落花生油から選ばれた1種又は2種以上を使用した特許請求の範囲第7項記載の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、γ-リノレン酸を含む脂質を微生物を利用して製造する方法に関する。

従来の技術

従来、γ-リノレン酸を含む脂質を微生物を利用して製造する方法として、下記①～⑤に示すものが知られている。

- ① モルティエラ属の糸状菌を炭化水素を炭素源として培養し、その培養物より脂質を採取する方法（特開昭57-144986号公報）。
- ② モルティエラ属の糸状菌を高濃度の炭水化物を炭素源として培養し、その培養物より脂質を採取する方法（特開昭60-168391号公報）。
- ③ ジルベルテラ属の脂質生産菌を炭素源濃度の高い培地で培養し、その培養物より脂質を採取する方法（特開昭61-37097号公報）。
- ④ タムニディウム属の脂質生産菌を炭素源濃度の高い培地で培養し、その培養物より脂質を採取する方法（特開昭61-37096号公報）。
- ⑤ カニンガメラ属の脂質生産菌を炭素源濃度

る菌、リゾプス・オリゼー等のリゾプス属に属する菌又はシンセファラストラム・ラセモサム等のシンセファラストラム属に属する菌を脂肪酸又はそのエステルを炭素源として培養した場合、炭化水素、炭水化物等を炭素源とした場合と同等もしくはそれ以上の増殖を示し、脂肪酸又はそのエステルがγ-リノレン酸に効率良く変換されること、従ってこの培養物より炭化水素、炭水化物等を炭素源として培養した場合とほぼ同等のγ-リノレン酸含有量を有するγ-リノレン酸含量の高い脂質が得られることを見出し、本発明をなすに至ったものである。

従って、本発明は、アビシディア属、モルティエラ属、ムコール属、リゾプス属又はシンセファラストラム属に属する菌を脂肪酸又はそのエステルを炭素源として培養し、この脂肪酸又はそのエステルをγ-リノレン酸に変換することの特徴とするγ-リノレン酸を含有する脂質の製造方法を提供する。

本発明においては、上述した菌がγ-リノレン

酸の高い培地で培養し、その培養物より脂質を採取する方法（特開昭60-126091号公報）。

発明が解決しようとする問題点

しかしながら、従来の方法はいずれもn-アルカン等の炭化水素、グルコース等の炭水化物、或いは酢酸ナトリウムなどを炭素源として培養を行うものであり、他の物質を炭素源とする方法はこれまで提案されていない。このため、従来より更に他の物質を炭素源として微生物を培養し、この培養物からγ-リノレン酸を含む脂質を得ることが望まれていた。

問題点を解決するための手段及び作用

本発明者らは、上記事情に鑑み、種々の物質を炭素源として微生物を培養し、この培養物からγ-リノレン酸を含む脂質を得ることにつき種々研究を行っているうち、アビシディア・コリムビフェラ等のアビシディア属に属する菌、モルティエラ・イサベリナ等のモルティエラ属に属する菌、ムコール・アンビグアス等のムコール属に属す

菌以外の脂肪酸又はそのエステルを炭素源としてこの脂肪酸又はそのエステルをγ-リノレン酸に変換しながら増殖し、従ってこの増殖した菌体から適宜手段で脂質を分離することにより、γ-リノレン酸含量の高い脂質を得ることができるものである。

以下、本発明につき更に詳しく説明する。

本発明において用いるアビシディア属、モルティエラ属、ムコール属、リゾプス属、シンセファラストラム属の菌の種類に特に制限はなく、これらの属に属するものであればいずれのものでも使用し得るが、特に上述したアビシディア・コリムビフェラ (*Absidia corymbifera*, IFO 4010)、モルティエラ・イサベリナ (*Mortierella isabellana*, IFO 7873)、ムコール・アンビグアス (*Mucor ambiguus*, IFO 6742)、リゾプス・オリゼー (*Rhizopus oryzae*, IFO 5418)、シンセファラストラム・ラセモサム (*Syncephalastrum racemosum*, IFO 4816)等を好適に使用し得る。

また、炭素源として用いる脂肪酸又はそのエス

テルの種類に制限はなく、飽和、不飽和、また直鎖、分枝鎖等の区別なく種々のものを使用し得るが、炭素数8~22、特に8~18の脂肪酸、例示するとカブロン酸、カプリル酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸等を用いることが好ましい。また、エステルとしては、これら脂肪酸のメタノール、エタノール、プロパノール等の低級1価アルコール又はグリセリン等の多価アルコールのエステルが好ましく、例示すると、主にパルミチン酸及びオレイン酸より構成されるパーム油、主にオレイン酸及びリノール酸より構成される大豆油、コーン油、落花生油、米糠油、主にオレイン酸、リノール酸及びエルシン酸より構成されるナタネ油、主にオレイン酸及びリノレイン酸より構成されるヒマシ油等を用いることができる。

なお、これら脂肪酸及びそのエステルは1種を単独で用いてもよく、2種以上を併用しても差支えない。

更に、本発明においては培養に際して適切な窒

素源を与えることが望ましい。この場合、窒素源としては $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 等の無機窒素源を用いることもできるが、尿素、ペプトン、大豆蛋白、コーン・スチープ・リカー等の有機窒素源を用いることがより好適である。この場合、炭素源として加えた脂肪酸又はそのエステルと大豆蛋白、コーン・スチープ・リカー、ペプトン、ポリペプトン、カザミノ酸、乾燥酵母又はスキムミルク等の有機窒素源との重量比を3:1~1:2の範囲にすることにより脂質中のγ-リノレン酸含量を高めることができる。

また、本発明においては、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 等の無機塩、その他必要に応じて酵母エキスや麦芽エキス等の増殖因子、ポリオキシエチレン(60)ソルビタン脂肪酸エステル等の界面活性剤、その他の栄養源などを培養時に添加することができる。

本発明において、上記菌類の培養方法に限定はないが、液体培地で振盪培養、通気攪拌培養によ

り培養を行うか、或いは液体培地をスポンジ等に含まして固体培養により培養を行うことが好ましい。この場合、上記脂肪酸又はそのエステルは液体培地1ℓ中に10~100g加えることが適当であり、また培地のpHは3.5~5.5、培養温度は15~35℃、培養時間は5~10日程度とすることが好適である。

なお、培養終了後、培養物からγ-リノレン酸を含む脂質を採取する方法としては公知の手段を採用し得、例えば培養物より菌を集菌した後、破砕助剤を用いてホモジナイザーで菌体の破砕を行うと共に、抽出溶媒により脂質を抽出する方法などを好適に採用し得る。

次に実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

実施例 1

パーム油30g、大豆蛋白3g、 KH_2PO_4 3g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g、酵母エキス0.2g、麦芽エキス0.2g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0mg、 $\text{CaCl}_2 \cdot$

$2\text{H}_2\text{O}$ 1.2mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.2mg及び $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0mgを蒸留水1ℓに混ぜ、pH4.5に調整した。これを500ml容の坂口フラスコに50mlずつ分注した。これに下記第1表に示す菌株をそれぞれ接種した後、温度30℃、振幅約7cm、振盪数200回/分で8日間培養した。培養後、ガラス繊維濾紙で集菌し、蒸留水とヘキサンのそれぞれ数回洗浄して残っている油を取り除いた。これをクロロホルム/メタノール=2/1(V/V)を抽出溶媒、ガラスビーズを破砕助剤としてホモジナイザーで菌体の破砕及び脂質の抽出を行った。抽出した脂質の不純物を除去した後、メチルエステル化し、ガスクロマトグラフィーで脂肪酸組成を分析した。結果を第1表に示す。

第 1 表

菌 株	IFO No	D.C. (g/d)	T.L./D.C. (%)	γ/T.L. (%)
<i>Absidia corymbifera</i>	4010	16.0	42	3.0
<i>Mucor ambigus</i>	6742	14.2	35	3.6
<i>Mortierella isabellana</i>	7873	13.0	46	4.5
"	6739	14.0	38	3.8
<i>Rhizopus oryzae</i>	5418	20.6	36	4.0
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	4816	17.2	43	4.6
"	4828	17.7	24	3.6

*D.C.=菌体生成量

T.L.=生成脂質量

 γ = γ -リノレン酸生成量 (第2~4表においても同じ)実施例 2

炭素源としてパーム油を大豆油、米糠油、ナタネ油、コーン油、ヒマシ油或いは落花生油に変えた以外は実施例1と同様な培地を用い、これに *Mortierella isabellana* (IFO 7873) を植菌し、実施例1に示した条件で培養及び分析を行った。第2表にその結果を示す。

第 2 表

炭 素 源	D.C. (g/l)	T.L./D.C. (%)	γ /T.L. (%)
大豆油	14.3	35	3.3
米 糠 油	18.5	40	3.8
ナタネ油	21.2	37	1.9
コーン油	16.7	39	2.9
ヒマシ油	8.7	35	8.3
落花生油	11.1	50	2.3

実施例 3

オレイン酸 30 g, 大豆蛋白 3 g, KH_2PO_4 .

第 3 表

菌 株	IFO No	D.C. (g/l)	T.L./D.C. (%)	γ /T.L. (%)
<i>Absidia corymbifera</i>	4010	9.0	40	4.0
<i>Mucor ambiguus</i>	6742	7.2	29	4.6
<i>Mortierella isabellana</i>	7873	5.5	50	6.4
"	6739	6.4	62	5.8
<i>Rhizopus oryzae</i>	5418	18.6	30	4.2
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	4816	10.4	54	3.0
"	4828	10.9	71	2.0

実施例 4

オレイン酸メチルエステルとリノール酸メチルエステルとの9:1混合物 30 g, 大豆大豆蛋白 3 g, KH_2PO_4 3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, 酵母エキス 0.2 g, 麦芽エキス 0.2 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mg 及び $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mg を蒸留水 1 l に混ぜ、pH 4.5 に調整した。これを 500 ml の坂口フラスコに 100 ml ずつ分注し、下記第4表に示す菌株をそれぞれ植菌した後、実施例1と同様な培養条件で8日間培養した。その後、培養物を実施例1と同様な方法で分析した結果を第

3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, 酵母エキス 0.2 g, 麦芽エキス 0.2 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mg 及び $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mg を蒸留水 1 l に混ぜ、pH 4.5 に調整した。これを 500 ml の坂口フラスコに 100 ml ずつ分注し、下記第3表に示す菌株をそれぞれ植菌した後、温度 30℃、振幅約 7 cm、振盪数 200 回/分で8日間培養した。培養後、ガラス繊維濾紙で集菌し、蒸留水とヘキサンのそれぞれ数回洗浄した。これをクロロホルム/メタノール = 2/1 (V/V) を抽出溶媒、ガラスビーズを破砕助剤としてホモジナイザーで菌体の破砕及び脂質の抽出を行った。抽出した脂質の不純化物を除去した後、メチルエステル化してガスクロマトグラフィーで脂肪酸組成を分析した。第3表に結果を示す。

4表に示す。

第 4 表

菌 株	IFO No	D.C. (g/l)	T.L./D.C. (%)	γ /T.L. (%)
<i>Mortierella isabellana</i>	7873	3.7	30	6.1
<i>Rhizopus oryzae</i>	5418	4.3	45	4.2

実施例 5

パーム油 10 g, コーン・スチープ・リカー (C.S.L と略す) 3 g (重量比 10:3), 酵母エキス 0.5 g, 麦芽エキス 0.5 g, KH_2PO_4 3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mg 及び $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mg を蒸留水 1 l に混ぜ、pH 4.1 に調整した。また比較としてパーム油 10 g, コーン・スチープ・リカー 1 g (重量比 10:1) とした他は上記成分を同様に混ぜたものを調製した。

これらを 500 ml 容の坂口フラスコに 50 ml ずつ分注した。これに下記第5表に示す菌株をそれぞれ植菌した後、温度 30℃、振幅約 7 cm、振盪数

200回/分で6日間培養した。培養後、ガラス繊維尹紙で集菌し、蒸留水とヘキサンでそれぞれ数回洗浄して残存しているパーム油を除去した。これをクロロホルム/メタノール=2/1(V/V)を抽出溶媒、ガラスビーズを破砕助剤としてホモジナイザーで菌体の破砕及び脂質の抽出を行った。抽出した脂質の不純物を除去した後、メチルエステル化してガスクロマトグラフィーで脂肪酸組成を分析した。結果を第5表に示す。

第 5 表

菌 株	IFO 株	C.S.L.=コーン・ステープ・リカー				重量比			
		(パーム油:C.S.L.=10:3)		(パーム油:C.S.L.=10:1)		D.C.		γ/T.L.	
		D.C. (g/d)	T.L./D.C. (%)	D.C. (g/d)	T.L./D.C. (%)	D.C. (g/d)	T.L./D.C. (%)	γ/T.L. (%)	γ/T.L. (%)
Absidia corymbifera	4010	7.5	17	6.9	23	9.4	23	3.0	3.0
Mucor sabignus	5742	6.4	30	8.7	35	8.4	35	3.6	3.6
Rhizopus oryzae	5418	5.8	24	6.0	30	8.0	30	4.0	4.0
Syncephalastrum racemosum	4816	8.1	22	8.4	31	10.1	31	4.6	4.6
"	4828	8.8	18	6.7	24	10.4	24	3.6	3.6

D.C.=乾燥菌体重量 T.L.=生成総脂質量 γ=γ-リノレン酸生成量

第5表からわかるように、いずれの菌株においても炭素源(パーム油)と有機態の窒素源(C.S.L.)の重量比が10:3の場合は10:1の場合の1.5倍以上の濃度(γ/T.L.)のγ-リノレン酸を含有する脂質を生成する。

実施例6

実施例5でコーン・ステープ・リカーの仕込量を1~20g(重量比10:1~10:20)とした他は、実施例5と同様な培地を調製した。これを500ml容坂口フラスコに50ml分注し、Mortierella isabellana(IFO 7873)を植菌した。これを実施例5と同様の条件で培養及び分析を行った。第6表にその結果を示す。

第 6 表

重量比 (パーム/C.S.L.)	D.C. (g/d)	T.L./D.C. (%)	γ/T.L. (%)
10/1	6.5	45	4.5
10/3	8.0	46	6.6
10/5	7.4	30	9.4
10/10	9.9	30	9.1
10/15	10.8	28	8.9
10/20	11.9	26	7.4

*C.S.L.=コーン・ステープ・リカー

パーム油とコーン・ステープ・リカーの重量比が10/3~10/20の場合、10/1に比べてγ-リノレン酸含量の高い脂質が得られることがわかる。

実施例7

パーム油50g、大豆蛋白15g(重量比10:3)、酵母エキス1.0g、麦芽エキス1.0g、KH₂PO₄1.0g、MgSO₄·7H₂O0.3g、FeSO₄·7H₂O10mg、CaCl₂·2H₂O1.2mg、CuSO₄·5H₂O0.2mg、ZnSO₄·7H₂O1.0mgを蒸留水1Lに混ぜ、pH4.5に調整した。この培地2Lを2Lジャーファーマンターに入れ、Mortierella isabellana(IFO 7873)を植菌した後、30℃、通気量1vvm、攪拌回転数400rpmで150時間培養した。培養後、実施例5と同様に処理した結果、乾燥菌体59g、総脂質24gが得られた。このものの脂肪酸組成を第7表に示す。

第 7 表

脂肪酸	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3(γ)
(%)	23.6	2.5	49.4	13.6	8.2

発明の効果

以上説明したように、本発明方法は脂肪酸又はそのエステルからγ-リノレン酸を効率良く製造し得るものであり、従って本発明によれば、動植物油脂より採れる安価な脂肪酸又はそのエステルから付加価値の高いγ-リノレン酸を含む油脂を製造することができる。

手 続 税 金 納 入 印 (自 発)

昭和62年10月30日

特許庁長官 小 川 邦 夫 殿

1. 事件の表示

昭和61年特許願第279147号

2. 発明の名称

γ-リノレン酸を含有する脂質の製造方法

3. 補正をする者

事件との関係

特許出願人

住 所 東京都墨田区本所1丁目3番7号
氏 名 (676) ライオン 株式会社
代表者 小 林 敦

4. 代 理 人 〒104

住 所 東京都中央区銀座3丁目11番14号
ダバクリエートビル5階 電話 (545) 6454
氏 名 弁理士 (7930) 小 島 隆 司

5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄、六



万 事 休 止

小 島

6. 補正の内容

(1) 明細書第10頁第12行目、第12頁第13行目乃至第14行目及び第15頁第7行目にそれぞれ「抽出した脂質の」とあるのをいずれも「抽出した脂質を鹸化して」と訂正する。

以 上